



(19)
 Bundesrepublik Deutschland
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2008 026 058 A1** 2009.12.03

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2008 026 058.4**

(22) Anmeldetag: **30.05.2008**

(43) Offenlegungstag: **03.12.2009**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/10** (2006.01)

(71) Anmelder:

QIAGEN GmbH, 40724 Hilden, DE

(74) Vertreter:

**Michalski Hüttermann & Partner Patentanwälte,
 40221 Düsseldorf**

(72) Erfinder:

**Fabis, Roland, Dr., 51375 Leverkusen, DE;
 Homann-Wischinski, Anke, Dr., 40764 Langenfeld,
 DE; Voss, Thorsten, Dr., 51377 Leverkusen, DE;
 Hanselle, Thomas, Dr., 40723 Hilden, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
 zu ziehende Druckschriften:

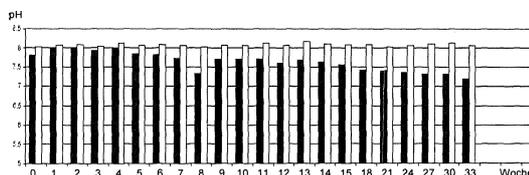
EP 15 66 437 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Rechercheantrag gemäß § 43 Abs. 1 Satz 1 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz verwendbar zur Isolierung und/oder Reinigung von Nukleinsäuren**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz verwendbar zur Isolierung und/oder Reinigung von Nukleinsäuren sowie ein Verfahren zur Isolierung und/oder Reinigung von Nukleinsäuren.



Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz sowie ein Verfahren zur Isolierung und/oder Reinigung von Nukleinsäuren. Das Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz sowie das Verfahren sind insbesondere für Anwendungszwecke in der molekularen Diagnostik geeignet.

Technischer Hintergrund

[0002] Im Stand der Technik sind eine Vielzahl von Verfahren zur Isolierung und/oder Reinigung von Nukleinsäuren wie Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder Ribonukleinsäure (RNA) aus Zellen, Zellkulturen oder Viruskulturen bekannt.

[0003] Hierbei beruhen "klassische" Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren, die vielfach manuell durchgeführt werden, auf einem einstufigen Verfahren, bei dem nach Zusatz eines wässrigen Puffers und eines organischen Extraktionsmittels eine Extraktion durchgeführt wird. Die Nukleinsäuren verbleiben in der wässrigen Phase und können nach Abtrennung der organischen Phase, die unerwünschte Begleitstoffe enthält, isoliert werden.

[0004] Diese Verfahren verwenden zum Einen üblicherweise gesundheitsschädigende organische Extraktionsmittel wie Chloroform oder Phenol, zum anderen verbleiben wasserlösliche Verunreinigungen in der die Nukleinsäuren enthaltenden wässrigen Phase, die in weiteren Reinigungsschritten abgetrennt werden müssen.

[0005] Daher hat im Stand der Technik ein alternatives Verfahren an Bedeutung gewonnen, das auf der selektiven Adsorption von Nukleinsäuren an festen, meist mineralischen Trägern wie Siliciumdioxid, basiert. Das Bindeprinzip basiert auf einer reversiblen Bindung der Nukleinsäuren unter Einfluss von so genannten chaotropen Salzen und/oder Alkohol an die Siliciumdioxidoberfläche. In einem mehrstufigen Verfahren werden der Nukleinsäuren-enthaltenden Probe verschiedene Lösungen oder Mischungen, meist Lyse-, Binde-, Wasch- und/oder Elutionslösungen oder -mischungen, zugesetzt und in einem abschließenden Verfahrensschritt wird die gereinigte Nukleinsäure von dem spätestens im Bindschritt zugegebenen Träger eluiert.

[0006] Das Grundprinzip beider Verfahren beruht darauf, dass in einem ersten Schritt die Zellen, insbesondere die pflanzlichen, tierischen, menschlichen, bakteriellen oder Virus-Zellen lysiert werden. Hierzu werden die Zellen zunächst mit einem Lysepuffer inkubiert, der die Zellen aufschließt.

[0007] Im Stand der Technik sind Puffer und Verfahren zum Lysieren zellulärer Materialien einer biologischen Probe bekannt. Bekannte Lysepuffer enthalten häufig das Tensid Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween® 20). Dieses Tensid wird dazu verwendet, im Rahmen der Zellyse Verunreinigungen in einen löslichen oder stabilisierten Zustand zu überführen, um diese von der Nukleinsäure abzutrennen.

[0008] Nachteilig an Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween® 20) enthaltenden Lysepuffern ist, dass diese bei Lagerung nicht stabil sind. So sinkt beispielsweise der pH Wert ab. Nachteilig ist insbesondere, dass bei der Verwendung dieser Lysepuffer nach Lagerung die Ausbeute der isolierten Nukleinsäuren abnimmt. Darüber hinaus ist nachteilig, dass die Nukleinsäuren enthaltenden Eluate getrübt sind, was auf die Anwesenheit von Verunreinigungen hinweist, die die weitere Verwendung der isolierten Nukleinsäuren stören können.

[0009] Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, ein Mittel zur Verfügung zu stellen, das wenigstens einen der vorgenannten Nachteile des Standes der Technik überwindet und dabei möglichst gleich gute oder bessere Lyse-, Binde- und/oder Wascheigenschaften aufweist.

[0010] Die Aufgabe wird durch ein Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz gemäß Anspruch 1 der vorliegenden Erfindung gelöst. Demgemäß wird ein Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz zur Verfügung gestellt umfassend:

- wenigstens eine chaotrope Verbindung,
- wenigstens eine Pufferverbindung vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin (Tricin), N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycin (BICIN), N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES), Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure) (PIPES), N-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure (CHES), 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES), 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) und/oder Phosphatpuffer, und
- wenigstens ein polyoxyethylen-basiertes nicht-ionisches Tensid ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen-Fettalkoholether, Polyoxyethylen-Alkylphenylether und/oder Polyoxyethylen-Polyoxypropylen Blockcopolymeren im Bereich von $\geq 8\%$ (Gewicht/Volumen) bis $\leq 50\%$ (Gewicht/Volumen), bezogen auf das Gesamtvolumen des Reagenzes.

[0011] Unter dem Begriff "Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz" werden im Sinne der vorliegenden Erfindung Reagenzien verstanden, die Lysereagenzien, Bindereagenzien oder Waschreagenzien sind, wie auch Reagenzien, die sowohl als Lyse- wie auch als Binde- als auch als Waschreagenz wirken kön-

nen. Insbesondere werden im Sinne der vorliegenden Erfindung unter dem Begriff "Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz" auch Mischungen aus erfindungsgemäßen Lysereagenzien, Bindereagenzien und/oder Waschreagenzien verstanden.

[0012] Unter dem Begriff "Reagenz" werden im Sinne der vorliegenden Erfindung Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz verstanden.

[0013] Unter dem Begriff "chaotrope Verbindung" im Sinne der vorliegenden Erfindung werden Verbindungen verstanden, die denaturierend auf Proteine wirken und die insbesondere die regelmäßige, auf Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen beruhende Struktur, von flüssigem Wasser zerstören.

[0014] Unter dem Begriff "Pufferverbindung" im Sinne der vorliegenden Erfindung werden Verbindungen verstanden, die eine Pufferung oder Stabilisierung des pH-Werts einer wässrigen Lösung zur Verfügung stellen können.

[0015] Unter dem Begriff "Phosphatpuffer" werden im Sinne der vorliegenden Erfindung Phosphatsalze wie Dihydrogenphosphate, beispielsweise Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) oder Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) und Hydrogenphosphate, beispielsweise Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) oder Dikaliumhydrogenphosphat verstanden. Die Verwendung von Mischungen der Phosphatsalze ist ebenfalls möglich. Ein weiterer gängiger Phosphatpuffer ist PBS (phosphate buffered saline), der Natriumchlorid, Na_2HPO_4 , Kaliumchlorid und KH_2PO_4 enthält.

[0016] Unter dem Begriff "Nukleinsäure" im Sinne der vorliegenden Erfindung werden insbesondere – aber nicht darauf beschränkt – natürliche, vorzugsweise isolierte lineare, verzweigte oder zirkuläre Nukleinsäuren wie RNA, insbesondere mRNA, siRNA, miRNA, snRNA, tRNA, hnRNA oder Ribozyme, DNA, Plasmid DNA und dergleichen, synthetische oder modifizierte Nukleinsäuren, in vitro Transkripte, beispielsweise Oligonukleotide, insbesondere für die PCR verwendbare Primer, Sonden oder Standards, mit Digoxigenin, Biotin oder Fluoreszenzfarbstoffen markierte Nukleinsäuren, methylierte Nukleinsäuren oder sogenannte PNAs ("peptide nucleic acids") verstanden.

[0017] Unter dem Begriff "Tensid" werden im Sinne der vorliegenden Erfindung grenzflächenaktive und/oder oberflächenaktive Substanzen verstanden.

[0018] Unter dem Begriff "Fettalkohol" werden im Sinne der vorliegenden Erfindung Alkohole mit einer Kettenlänge einer Anzahl von sechs bis 22 Kohlenstoffatomen bevorzugt 8 bis 20 Kohlenstoffatomen, vorzugsweise 10 bis 18 Kohlenstoffatomen, beson-

ders bevorzugt 12 bis 18 Kohlenstoffatomen verstanden. Insbesondere bevorzugt sind Alkohole mit einer Anzahl von 12, 14, 16 oder 18 Kohlenstoffatomen. Die Fettalkohole können zwar einfach oder mehrfach ungesättigt sein, bevorzugt handelt es sich jedoch um gesättigte Fettalkohole.

[0019] „Polyoxyethylen“ steht im Sinne der vorliegenden Erfindung für eine $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ -Einheit, wobei n vorzugsweise eine ganze Zahl von 2 bis 150, weiter bevorzugt von 4 bis 120, noch weiter bevorzugt von 8 bis 80 und am meisten bevorzugt eine ganze Zahl ausgewählt aus 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 oder 150, darstellt.

[0020] „Polyoxypropylen“ steht im Sinne der vorliegenden Erfindung für eine $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ -Einheit, wobei n vorzugsweise eine ganze Zahl von 10 bis 90, weiter bevorzugt von 20 bis 80, noch weiter bevorzugt von 30 bis 70 ist und am meisten bevorzugt ist n eine ganze Zahl ausgewählt aus 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 oder 90.

[0021] Unter der Angabe "% Gewicht/Volumen", "% (Gewicht/Volumen)" oder "% (w/v)" ist im Sinne der vorliegenden Erfindung beispielsweise die Grammenge des Tensids pro 100 ml Reagenz oder Zusammensetzung zu verstehen.

[0022] In überraschender Weise wurde gefunden, dass die erfindungsgemäßen Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenzien eine verbesserte Stabilität bei Lagerung aufweisen. So können erfindungsgemäße Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenzien beispielsweise während einer Lagerung bei Raumtemperatur von drei, vorzugsweise sechs Monaten, weiter bevorzugt mindestens acht Monaten einen stabilen pH-Wert aufweisen. Insbesondere können erfindungsgemäße Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenzien auch bei einer Lagerung bei erhöhten Temperaturen beispielsweise bei 50°C über mehrere Wochen hinweg, vorzugsweise über mehrere Monate, einen stabilen pH-Wert aufweisen.

[0023] Dies hat sich für Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenzien als vorteilhaft herausgestellt, da vermutet wird, dass die Instabilität des pH-Wertes mit dem Auftreten von Verunreinigungen in dem nach der Isolation erhaltenen Eluat enthaltend die Nukleinsäuren in Verbindung steht.

[0024] Erfindungsgemäß bevorzugte polyoxyethylen-basierte nicht-ionische Tenside sind Polyoxyethylen-Fettalkoholether.

[0025] Beispiele für geeignete Polyoxyethylen-Fettalkoholether sind polyethoxylierte Lauryl-, Cetyl-, Oleyl- oder Stearylalkohole, die allein oder im Gemisch verwendbar sind.

[0026] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst der Polyoxyethylen-Fettalkoholether einen Fettalkohol-Bestandteil, der 6 bis 22 Kohlenstoffatome aufweist, und einen Polyoxyethylen-Bestandteil, der 2 bis 150 (CH₂CH₂O)-Einheiten enthält.

[0027] Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Polyoxyethylen-Fettalkoholether ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylenlaurylether, Polyoxyethylencetylether, Polyoxyethylenstearylether und/oder Polyoxyethylenoleylether.

[0028] Polyoxyethylen-basierte nicht-ionische Tenside insbesondere Polyoxyethylen-Fettalkoholether haben sich für eine breite Spanne von Anwendungen innerhalb der vorliegenden Erfindung als vorteilhaft herausgestellt. Insbesondere bei Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenzien umfassend Pufferverbindungen vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin (Tricin), N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-glycin (BICIN), N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES), Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure) (PIPES), N-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure (CHES), 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES), 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) und/oder Phosphatpuffer kann eine verbesserte Stabilität bei Lagerung beobachtet werden.

[0029] Es konnte festgestellt werden, dass vorteilhafte Effekte der erfindungsgemäßen Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenzien insbesondere bei einem Gehalt an polyoxyethylen-basiertem nicht-ionischem Tensid ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen-Fettalkoholether, Polyoxyethylen-Alkylphenylether und/oder Polyoxyethylen-Polyoxypropylen Blockcopolymeren im Bereich von $\geq 8\%$ (Gewicht/Volumen) bis $\leq 50\%$ (Gewicht/Volumen), bezogen auf das Gesamtvolumen des Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenzes, auftraten.

[0030] Für den Fall, dass Mischungen von Tensiden verwendet werden, handelt es sich bei den Konzentrationsangaben vorzugsweise um den Gesamtgehalt an Tensid, beispielsweise im Bereich von insgesamt $\geq 8\%$ (Gewicht/Volumen) bis $\leq 50\%$ (Gewicht/Volumen), bezogen auf das Gesamtvolumen des Reagenzes.

[0031] Dies hat sich insbesondere für Lysereagenzien innerhalb der vorliegenden Erfindung als vorteilhaft herausgestellt.

[0032] Bevorzugte Polyoxyethylen-Fettalkoholether sind ethoxylierte Lauryl-, Cetyl-, Oleyl- oder Stearylalkohole ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylenlaurylether, Polyoxyethylencetylether, Polyoxyethylenstearylether und/oder Polyoxyethylenoleylether.

[0033] Bevorzugte Polyoxyethylen-Fettalkoholether sind ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen(4)laurylether, Polyoxyethylen(23)laurylether, Polyoxyethylen(2)cetylether, Polyoxyethylen(10)cetylether, Polyoxyethylen(20)cetylether, Polyoxyethylen(2)stearylether, Polyoxyethylen(10)stearylether, Polyoxyethylen(20)stearylether, Polyoxyethylen(2)oleylether, Polyoxyethylen(10)oleylether, Polyoxyethylen(20)oleylether und/oder Polyoxyethylen(100)stearylether. Hierbei geben die Zahlen die durchschnittliche Anzahl der Ethylenoxid-Einheiten an.

[0034] Insbesondere Polyoxyethylen-Fettalkoholether, die unter der Handelsbezeichnung Brij[®] beispielsweise von der Firma ICI Surfactants vertrieben werden, sind erfindungsgemäß geeignet.

[0035] Beispiele geeigneter Polyoxyethylen-Lauryl-, -Cetyl-, -Oleyl- oder -Stearylalkoholether sind vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen(4)laurylether (Brij[®] 30), Polyoxyethylen(23)laurylether (Brij[®] 35), Polyoxyethylen(2)cetylether (Brij[®] 52), Polyoxyethylen(10)cetylether (Brij[®] 56), Polyoxyethylen(20)cetylether (Brij[®] 58), Polyoxyethylen(2)stearylether (Brij[®] 72), Polyoxyethylen(10)stearylether (Brij[®] 76), Polyoxyethylen(20)stearylether (Brij[®] 78), Polyoxyethylen(2)oleylether (Brij[®] 92), Polyoxyethylen(10)oleylether (Brij[®] 97), Polyoxyethylen(20)oleylether (Brij[®] 98) und/oder Polyoxyethylen(100)stearylether (Brij[®] 700).

[0036] Geeignete Polyoxyethylen-Lauryl-, -Cetyl-, -Oleyl- oder -Stearylalkoholether können auch in Pulverform verwendbar sein, beispielsweise Polyoxyethylen(21)stearylether Powder (Brij[®] 721 P).

[0037] Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenzes kann dadurch zur Verfügung gestellt werden, dass erfindungsgemäße Lyse-, Binde- und/oder Waschreagen-

zien bei einer Verwendung zur Isolierung und/oder Reinigung von Nukleinsäuren auch nach einer mehrwöchigen oder mehrmonatigen Lagerung des Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenzes bei Raumtemperatur oder bei erhöhten Temperaturen beispielsweise bis 50°C eine unverändert gute Ausbeute der isolierten Nukleinsäuren zeigen, während Puffer aus dem Stand der Technik, insbesondere Puffer, die Tween®-20 enthalten, nach Lagerung niedrigere Ausbeuten an Nukleinsäuren zeigen.

[0038] Insbesondere ist von Vorteil, dass bei Verwendung erfindungsgemäßer Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenzien auch nach mehrwöchiger oder mehrmonatiger Lagerung ein Eluat enthaltend die Nukleinsäuren nicht oder nur geringfügig getrübt ist. Ein Vorteil ist somit, dass keine oder zumindest deutlich weniger Verunreinigungen im Eluat enthalten sein können, wodurch die weitere Verwendung des die Nukleinsäuren enthaltenden Luats wesentlich vorteilhafter ist, da weitere zeitaufwendige und die Ausbeute an Nukleinsäuren verringernde Reinigungsschritte entfallen können.

[0039] Weniger bevorzugt sind Laurylalkoholether des Polyoxyethylens, beispielsweise Polyoxyethylen(4)laurylether (Brij® 30) oder Polyoxyethylen(23)laurylether (Brij® 35) in den Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenzien umfasst. In einer bevorzugten Ausführungsform enthalten die Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenzien daher keine diese Substanzen. In einer besonderen bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Polyoxyethylen-Fettalkoholether des Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenzes nicht um Polyoxyethylenlaurylether.

[0040] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Polyoxyethylen-Fettalkoholether ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylenlencetylether, Polyoxyethylenstearylether und/oder Polyoxyethylenoleylether.

[0041] Bevorzugt sind Polyoxyethylen-Cetyl-, Oleyl- oder Stearylalkoholether ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen(10)cetylether (Brij® 56), Polyoxyethylen(20)cetylether (Brij® 58), Polyoxyethylen(20)stearylether (Brij® 78) und/oder Polyoxyethylen(20)oleylether (Brij® 98).

[0042] Besonders bevorzugt sind Polyoxyethylen-Cetyl- oder Oleylalkoholether, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen(10)cetylether (Brij® 56), Polyoxyethylen(20)cetylether (Brij® 58) und/oder Polyoxyethylen(20)oleylether (Brij® 98).

[0043] Insbesondere erfindungsgemäße Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenzien umfassend Polyoxyethylen-Fettalkoholether insbesondere Polyoxyethy-

len-Cetyl- oder Oleylalkoholether zeichnen sich im Vergleich durch eine besonders gute Ausbeute an isolierten Nukleinsäuren insbesondere an Virus-DNA aus. Insbesondere konnte überraschend festgestellt werden, dass eine Isolation der DNA von Hepatitis-B-Virus (HBV) im Vergleich zu Tween® 20-haltigen Lysepuffern sowohl bei Verwendung eines frisch angesetzten Lyse- und/oder Bindereagenzes enthaltend Polyoxyethylen-Cetylalkoholether wie auch bei Verwendung nach mehreren Wochen, insbesondere mehrere Monate Lagerung bei 50°C eine deutlich erhöhte Ausbeute an Virus-DNA erhalten werden konnte. Dies kann insbesondere einen besonderen Vorteil des erfindungsgemäßen Lyse- und/oder Bindereagenzes zur Verfügung stellen, da das Hepatitis-B-Virus (HBV) als schwer lysierbares Virus gilt. Das erfindungsgemäße Lyse- und/oder Bindereagenz ist insbesondere geeignet zur Isolation von Virus-DNA.

[0044] Weiterhin geeignet sind polyethoxylierte Lauryl-, Cetyl-, Stearyl- oder Oleylalkohole, die beispielsweise unter den INCI-Bezeichnungen Laureth, Ceteth, Steareth oder Oleth erhältlich sind.

[0045] Beispiele weiter geeigneter ethoxylierter Dodecyl-, Lauryl-, Cetyl-, Stearyl- oder Oleylalkohole sind erhältlich unter Bezeichnungen ausgewählt aus der Gruppe umfassend Laureth-9, Laureth-4, Laureth-23, Ceteth-2, Ceteth-20, Steareth-2, Steareth-10, Steareth-20, Oleth-2, Oleth-10 und/oder Oleth-20.

[0046] Weiter bevorzugte polyoxyethylen-basierte nicht-ionische Tenside sind Polyoxyethylenalkylphenylether. Vorzugsweise weisen Polyoxyethylenalkylphenylether eine Alkylgruppe mit fünf bis 15 Kohlenstoffatomen, bevorzugt mit 6 bis 10 Kohlenstoffatomen, auf. Weiter bevorzugt sind verzweigte oder unverzweigte C₇- bis C₁₀-Alkylgruppen, insbesondere verzweigte oder unverzweigte C₈- und C₉-Alkylgruppen, besonders bevorzugt Isooctyl-Gruppen und Nonyl-Gruppen.

[0047] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Polyoxyethylenalkylphenylether ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen-nonylphenylether und/oder Polyoxyethylenisooctylphenylether. Geeignete Polyoxyethylen-nonylphenylether und Polyoxyethylenisooctylphenylether sind beispielsweise erhältlich unter der Handelsbezeichnung Igepal®, beispielsweise von der Firma BASF.

[0048] Beispiele geeigneter Polyoxyethylen-nonylphenylether und Polyoxyethylenisooctylphenylether sind vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen(2)nonylphenylether (Igepal® CO-210), Polyoxyethylen(2)isooctylphenylether (Igepal® CA-210), Polyoxyethylen(5)nonylphenylether (Igepal® CO-520), Polyoxyethylen(5)isooctylphenylether (Igepal® CA-520), Polyoxyethylen(9)nonylphen-

nylether (Igepal® CO-630), Polyoxyethylen(9)isooctylphenylether (Igepal® CA-630), Polyoxyethylen(12)nonylphenylether (Igepal® CO-720), Polyoxyethylen(12)isooctylphenylether (Igepal® CA-720) und/oder Polyoxyethylen(100)nonylphenylether (Igepal® CO-990).

[0049] Weiter bevorzugte polyoxyethylen-basierte nicht-ionische Tenside sind Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Blockcopolymere. Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Blockcopolymere werden auch als "Poloxamer" bezeichnet. Bevorzugt sind Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Blockcopolymere der Summenformel $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$, wobei "a" die der Zahl der Polyoxyethyleinheiten und "b" die der Zahl der Polyoxypropyleinheiten bezeichnet und das Gewichtsverhältnis a/b vorzugsweise im Bereich von 0,1 bis 3 liegt.

[0050] "a" liegt insbesondere im Bereich von 2 bis 150, bevorzugt im Bereich von 4 bis 120, weiter bevorzugt im Bereich von 8 bis 80, noch weiter bevorzugt beträgt "a" eine ganze Zahl ausgewählt aus 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 oder 150, und am meisten bevorzugt beträgt "a" eine ganze Zahl ausgewählt aus 2, 4, 10, 20, 23, 40, 55, 70 oder 100.

[0051] "b" liegt insbesondere im Bereich von 10 bis 90, bevorzugt im Bereich von 20 bis 80, weiter bevorzugt im Bereich von 30 bis 70, noch weiter bevorzugt beträgt "b" eine ganze Zahl ausgewählt aus 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 oder 90, und am meisten bevorzugt beträgt "b" eine ganze Zahl ausgewählt aus 15, 18, 23, 40, 55, 67 oder 75.

[0052] Weiter bevorzugt sind Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Blockcopolymere mit verschiedener Länge der Polyoxyethylen- und Polyoxypropylenblöcke, bei denen ein Polyoxypropylenblock mit 15 bis 67 Polyoxypropyleinheiten von zwei Polyoxyethylenblöcken mit unabhängig voneinander je 2 bis 130 Polyethyleinheiten eingeschlossen ist Geeignete Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Blockcopolymere sind beispielsweise erhältlich unter der Handelsbezeichnung

Pluronic® oder Synperonic®, beispielsweise von der Firma BASF.

[0053] Beispiele geeigneter Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Blockcopolymere sind vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Pluronic® PE 6200, Pluronic® PE 6400, Pluronic® PE 6800, Pluronic® PE 10300, Pluronic® PE 10500, Pluronic® F127, Pluronic® F108, Synperonic® F108, Synperonic® F 127 und/oder Synperonic® F68.

[0054] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst das Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz nicht-ionisches Tensid im Bereich von $\geq 9\%$ (Gewicht/Volumen) bis $\leq 40\%$ (Gewicht/Volumen), vorzugsweise im Bereich von $\geq 10\%$ (Gewicht/Volumen) bis $\leq 30\%$ (Gewicht/Volumen), bevorzugt im Bereich von $\geq 15\%$ (Gewicht/Volumen) bis $\leq 20\%$ (Gewicht/Volumen), bezogen auf das Gesamtvolumen des Reagenzes.

[0055] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die chaotrope Verbindung ein Natrium- oder Guanidiniumsalz, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Natriumiodid, Natriumperchlorat, Guanidiniumhydrochlorid, Guanidiniumthiocyanat, Guanidiniumisothiocyanat und/oder eine Mischung zweier oder mehrerer Salze davon. Bevorzugt ist die chaotrope Verbindung ein Guanidiniumsalz, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Guanidiniumhydrochlorid, Guanidiniumthiocyanat und/oder Guanidiniumisothiocyanat.

[0056] Insbesondere hat sich eine Kombination der vorgenannten chaotropen Verbindungen und der erfindungsgemäß enthaltenen polyoxyethylen-basierten nicht-ionischen Tenside für die Lyse von Viruszellen und die Isolierung von Nukleinsäuren aus Viruszellen als günstig erwiesen.

[0057] Geeignete Konzentrationen und Mengen der chaotropen Verbindungen können in Abhängigkeit von der Art der Proben oder den Parametern der Lyse variieren, wobei Konzentrationen der chaotropen Verbindung im Bereich von $\geq 0,1$ M bis ≤ 10 M generell günstig sind, bezogen auf das Gesamtvolumen des Reagenzes. Vorzugsweise liegt die Konzentrationen der chaotropen Verbindung des Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenzes im Bereich von $\geq 0,5$ M bis ≤ 8 M, bevorzugt im Bereich von $\geq 0,9$ M bis ≤ 6 M.

[0058] Bevorzugt liegt die Konzentrationen der chaotropen Verbindung des Lyse- und/oder Binde- und/oder Waschreagenzes im Bereich von ≥ 3 M bis ≤ 7 M, besonders bevorzugt im Bereich von ≥ 4 M bis ≤ 6 M. Bevorzugt liegt die Konzentrationen der chaotropen Verbindung des Binde- und/oder Waschreagenzes im Bereich von $\geq 0,5$ M bis ≤ 7 M, besonders bevorzugt im Bereich von ≥ 1 M bis ≤ 6 M. Bevorzugt liegt die Konzentrationen der chaotropen Verbindung

des Waschreagenzes im Bereich von $\geq 0,5$ M bis $\leq 3,5$ M, besonders bevorzugt im Bereich von $\geq 0,9$ M bis ≤ 3 M.

[0059] Gemäß einer weiter bevorzugten Ausführungsform umfasst das Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz wenigstens eine Pufferverbindung ausgewählt aus der Gruppe umfassend Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES), 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) und/oder Phosphatpuffer.

[0060] Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst das Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz wenigstens eine Pufferverbindung ausgewählt aus der Gruppe umfassend Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) und/oder N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES).

[0061] Das Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz ist vorzugsweise eine wässrige Lösung.

[0062] Gemäß einer weiter bevorzugten Ausführungsform weist das Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz einen pH-Wert im Bereich von ≥ 4 bis ≤ 12 , insbesondere im Bereich von ≥ 6 bis ≤ 11 , bevorzugt im Bereich von ≥ 7 bis ≤ 10 , besonders bevorzugt im Bereich von ≥ 8 bis ≤ 9 auf.

[0063] In bevorzugten Ausführungsformen kann das Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz, insbesondere das Lysereagenz, weiterhin Enzyme aufweisen, beispielsweise lytische Enzyme, insbesondere zum Beispiel Proteinase K, Protease (z. B. QIAGEN-Protease), Zymolase, Lyticase, Chromopeptidase, Lysostaphin, Lysozym, und, je nach Anwendung Nukleasen, zum Beispiel DNase und/oder RNase.

[0064] Erfindungsgemäße Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenzien können Lysereagenzien, Bindereagenzien oder Waschreagenzien sein, oder Mischungen aus erfindungsgemäßen Lysereagenzien, Bindereagenzien und/oder Waschreagenzien.

[0065] Ein Immobilisieren von Nukleinsäuren an einer Matrix auf Basis einer oder mehrerer Siliciumoxidverbindung in Gegenwart einer chaotropen Verbindung erfolgt vorzugsweise in Anwesenheit eines verzweigten oder unverzweigten Alkanols. Daher umfasst zumindest das Bindereagenz vorzugsweise ein verzweigtes oder unverzweigtes Alkanol.

[0066] Bevorzugt verwendbar sind kurzkettige verzweigte oder unverzweigte Alkanole mit einem bis fünf Kohlenstoffatomen. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das verzweigte oder unverzweigte Alkanol ein Alkohol mit einem bis fünf Kohlenstoffatomen, vorzugsweise ausgewählt

aus der Gruppe umfassend Methanol, Ethanol, Isopropanol, n-Propanol, verzweigtes oder unverzweigtes Butanol oder Pentanol und/oder Mischungen davon.

[0067] Sofern nicht anders beschrieben, umfassen die Definitionen "verzweigtes oder unverzweigtes Alkanol" insbesondere Propanol, Butanol und Pentanol alle denkbaren isomeren Formen der jeweiligen Reste. So umfasst beispielsweise verzweigtes oder unverzweigtes Propanol n-Propanol und iso-Propanol, verzweigtes oder unverzweigtes Butanol umfasst iso-Butanol, sec-Butanol und tert-Butanol und verzweigtes oder unverzweigtes Pentanol umfasst beispielsweise n-Pentanol und iso-Pentanol. Bevorzugt werden Alkohole ausgewählt aus der Gruppe umfassend Methanol, Ethanol, Isopropanol und/oder deren Mischungen verwendet, besonders bevorzugt werden Alkohole ausgewählt aus der Gruppe umfassend Ethanol, Isopropanol und/oder deren Mischungen verwendet.

[0068] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst das Bindereagenz verzweigtes oder unverzweigtes Alkanol im Bereich von ≥ 20 Vol.-% bis ≤ 80 Vol.-%, vorzugsweise im Bereich von ≥ 40 Vol.-% bis ≤ 70 Vol.-%, bevorzugt im Bereich von ≥ 50 Vol.-% bis ≤ 60 Vol.-%, bezogen auf das Gesamtvolumen des Bindereagenzes.

[0069] Bei Angaben der Volumen- und/oder Gewichtsgehalte versteht es sich für den Fachmann von selbst, dass die Volumen- und/oder Gewichtsgehalte der einzelnen Komponenten so gewählt sind, dass das Gesamtvolumen oder Gesamtgewicht der Komponenten 100 Vol.-% oder 100 Gew.-% nicht übersteigt.

[0070] Die vorliegende Erfindung bezieht sich außerdem auf die Verwendung eines erfindungsgemäßen Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenzes zur Isolierung und/oder Reinigung von Nukleinsäuren.

[0071] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Isolierung und/oder Reinigung von Nukleinsäuren aus einer Nukleinsäuren enthaltenden biologischen Probe, umfassend folgende Verfahrensschritte:

- a) Lysieren der biologischen Probe,
 - b) Immobilisieren der freigesetzten Nukleinsäure(n) an einer Matrix auf Basis einer oder mehrerer Siliciumoxidverbindung(en) in Gegenwart einer chaotropen Verbindung und/oder eines verzweigten oder unverzweigten Alkanols,
 - c) optional Waschen der auf der Matrix immobilisierten Nukleinsäure(n),
 - d) optional Abtrennen der gebundenen Nukleinsäure,
- wobei man das Lysieren und/oder Immobilisieren in Gegenwart einer Lyse- und/oder Bindezusammensetzung durchführt, umfassend:

– wenigstens eine chaotrope Verbindung, und
 – wenigstens ein polyoxyethylen-basiertes nicht-ionisches Tensid ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen-Fettalkoholether, Polyoxyethylen-Alkylphenylether und/oder Polyoxyethylen-Polyoxypropylen Blockcopolymeren im Bereich von $\geq 0,1\%$ (Gewicht/Volumen) bis $\leq 50\%$ (Gewicht/Volumen), bezogen auf das Gesamtvolumen der Zusammensetzung.

[0072] Unter dem Begriff "Zusammensetzung" werden im Sinne der vorliegenden Erfindung Lyse- und/oder Bindezusammensetzung verstanden.

[0073] In bevorzugten Ausführungsformen des Verfahrens verwendet man zum Lysieren der Probe ein erfindungsgemäßes Lysereagenz. Das Lysereagenz wird mit der zu lysierenden biologischen Probe in Kontakt gebracht. Ein oder mehrere Enzyme, können unabhängig voneinander, je nach Anwendung, zu verschiedenen Zeitpunkten zugesetzt werden. Die Probe kann in flüssiger Form vorliegen, beispielsweise im Fall flüssiger klinischer Proben. Klinische Proben, die feste Bestandteile enthalten, wie Stuhlproben oder Abstrichproben werden üblicherweise vor der weiteren Analyse in geeigneten wässrigen Lösungen suspendiert. Zellkulturen werden meist vor der Lyse vom Kulturmedium abgetrennt, jedoch wird zumeist eine völlige Trocknung der Probe vermieden. Im Falle von völlig getrockneten Proben beispielsweise Lyophilisate wird die Probe vor der weiteren Verarbeitung in wässrigen Lösungen rekonstituiert, beispielsweise Lyophilisate von Virus Standards. Daher enthalten die zu lysierenden Proben üblicherweise einen Anteil an Flüssigkeit. Diese in der Probe enthaltene Flüssigkeit wird mit dem Lysereagenz in Kontakt gebracht. Insofern liegt üblicherweise in einem Verfahren zur Isolierung und/oder Reinigung von Nukleinsäuren aus einer Probe eine Lysezusammensetzung vor, die Lysereagenz enthält sowie weitere Flüssigkeit der Probe oder bereits der Probe zugesetzter Lösungen.

[0074] Der Begriff "Lyse- und/oder Bindezusammensetzung" bezieht sich im Sinne der vorliegenden Erfindung auf ein Lyse- und/oder Bindereagenz, das in einem Verfahren zur Isolierung und/oder Reinigung von Nukleinsäuren aus einer Probe verwendet wird und neben Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz weitere Flüssigkeit enthalten kann. Die Lyse- und/oder Bindezusammensetzung kann vorzugsweise erfindungsgemäßes Lyse- und/oder Bindereagenz umfassen.

[0075] Gemäß einer weiter bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens wird das Immobilisieren der freigesetzten Nukleinsäure an einer Matrix auf Basis einer oder mehrerer Siliciumoxidverbindungen in Gegenwart einer erfindungsgemäßen Bindezusammensetzung durchgeführt.

[0076] Vorzugsweise wird erfindungsgemäßes Lyse- und/oder Bindereagenz mit der lysierten Probe in Kontakt gebracht. Die Lysezusammensetzung oder eine andere Lösung, in der das Lysieren durchgeführt wurde, kann vor dem in Kontakt Bringen mit dem Bindereagenz entfernt werden. Vorzugsweise wird die Lysezusammensetzung nicht entfernt. Bevorzugt wird ein Bindereagenz mit einer Probe umfassend Lysezusammensetzung in Kontakt gebracht.

[0077] Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens wird das Lysieren in Gegenwart einer Lysezusammensetzung und das Immobilisieren in Gegenwart einer Bindezusammensetzung durchgeführt. Entsprechend wird das Immobilisieren vorzugsweise in Gegenwart einer Mischung einer Lyse- und Bindezusammensetzung durchgeführt.

[0078] Optional kann das Lysereagenz auch gleichzeitig als Bindereagenz dienen. Weiter optional kann das Bindereagenz auch als Lysereagenz dienen. Auch optional kann das Bindereagenz auch als Waschreagenz dienen.

[0079] Die Lyse- und/oder Bindezusammensetzung umfasst wenigstens eine chaotrope Verbindung, und wenigstens ein polyoxyethylen-basiertes nicht-ionisches Tensid ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen-Fettalkoholether, Polyoxyethylen-Alkylphenylether und/oder Polyoxyethylen-Polyoxypropylen Blockcopolymeren im Bereich von $\geq 0,1\%$ (Gewicht/Volumen) bis $\leq 50\%$ (Gewicht/Volumen), bezogen auf das Gesamtvolumen der Zusammensetzung. Für den Fall, dass Mischungen von Tensiden verwendet werden, handelt es sich bei den Konzentrationsangaben vorzugsweise um den Gesamtgehalt an Tensid beispielsweise im Bereich von insgesamt $\geq 0,1\%$ (Gewicht/Volumen) bis $\leq 50\%$ (Gewicht/Volumen), bezogen auf das Gesamtvolumen der Zusammensetzung.

[0080] Ein derartiges Verfahren bietet für die Isolierung und/oder Reinigung von Nukleinsäuren aus einer Nukleinsäuren enthaltenden biologischen Probe beispielsweise den Vorteil, dass bei Verwendung einer Lyse- und/oder Bindezusammensetzung umfassend wenigstens eine chaotrope Verbindung und wenigstens ein polyoxyethylen-basiertes nicht-ionisches Tensid ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen-Fettalkoholether, Polyoxyethylen-Alkylphenylether und/oder Polyoxyethylen-Polyoxypropylen Blockcopolymeren im Bereich von $0,1\%$ (Gewicht/Volumen) bis $\leq 50\%$ (Gewicht/Volumen), bezogen auf das Gesamtvolumen der Zusammensetzung, auch nach mehrwöchiger oder mehrmonatiger Lagerung, bei Raumtemperatur oder erhöhten Temperaturen z. B. 50°C , ein Eluat enthaltend die Nukleinsäuren nicht oder nur geringfügig getrübt ist. In vorteilhafter Weise können somit keine oder zumindest deut-

lich weniger Verunreinigungen im Eluat enthalten sein. Hierdurch ist die weitere Verwendung des die Nukleinsäuren enthaltenden Eluats wesentlich vorteilhafter, da weitere zeitaufwendige und die Ausbeute an Nukleinsäuren verringemde Reinigungsschritte entfallen können.

[0081] Weiterhin bietet ein derartiges Verfahren für die Isolierung und/oder Reinigung von Nukleinsäuren aus einer Nukleinsäuren enthaltenden biologischen Probe beispielsweise den Vorteil, dass eine besonders gute Ausbeute an isolierten Nukleinsäuren insbesondere Virus-DNA beispielsweise der DNA von Hepatitis-B-Virus (HBV) ermöglicht wird.

[0082] Unter einer "biologischen Probe" kann ein Material auf partikulärer oder molekularer Basis verstanden werden, insbesondere Viren, Phagen und Zellen, wie Bakterienzellen, Hefe- oder Schimmelpilz-Zellen oder humane, tierische oder pflanzliche Zellen. Insbesondere eignet sich das Verfahren für die Isolierung von Nukleinsäuren wie DNA oder RNA aus Probenmaterialien humanen oder tierischen Ursprungs beispielsweise klinischer Proben, wie Blut, Plasma, Serum, Mund-, Rachen- und Nasenspülflüssigkeit, Broncheoalveoläre Lavagen, Urin, Zerebralflüssigkeit, Sputum, Speichel, Stuhl, Punktate, Abstriche, wie zum Beispiel Nasalabstriche, Wangenabstriche, Zervikalabstriche, Vaginalabstriche, Urethralabstriche, Pharyngealabstriche, Perinealabstriche, und Rektalabstriche, Stuhl, Punktate, Epithelabstriche, Biopsien und andere Gewebe- oder Knochenmarkproben, sowie Kulturen dieser Probenmaterialien in geeigneten Nährmedien.

[0083] Die Probe kann auch aus dem Bereich der Umweltanalytik, der Lebensmittelanalytik oder der molekularbiologischen Forschung stammen, beispielsweise aus Bakterienkulturen, Hefe- oder Pilzkulturen, Viruskulturen, Phagenlysaten oder Produkten von Amplifikationsverfahren, beispielsweise einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

[0084] Das erfindungsgemäße Verfahren ist vorzugsweise geeignet zur Isolierung und/oder Reinigung von genomischer DNA, mitochondrialer DNA, Plasmid-DNA, von Virus-DNA und Virus-RNA und zur Isolierung und Aufreinigung von intrazellulärer RNA aus Vollblut beispielsweise für Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (Reverse Transkription -Polymerase Chain Reaction, RT-PCR), sowie zur Isolierung und/oder Aufreinigung von in zellfreien Probenmaterialien enthaltenen frei zirkulierenden Nukleinsäuren. Das erfindungsgemäße Verfahren ist insbesondere für die Isolierung und/oder Aufreinigung von Virus-DNA geeignet.

[0085] In Schritt a) des Verfahrens erfolgt ein Lysieren der biologischen Probe. Grundsätzlich sind die nachstehend aufgeführten Methoden ausgewählt

aus der Gruppe umfassend Lyse mit Hilfe von ionischen und nicht-ionogenen Tenside, beispielsweise Natriumdodecylsulfat (SDS), Lithiumdodecylsulfat (LiDS) oder Natriumlauroylsarkosinat (Sarkosyl) in geeigneten Reagenzien oder Puffern, die Verwendung von chaotropen Salzen, mechanisches Auseinanderreißen beispielsweise mittels Ultraschall, einer "french press", Mahlen mit Partikeln wie Glaskugeln, Keramikugeln oder Metall-Partikeln oder in flüssigem Stickstoff, durch wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen oder Kochen, enzymatische Lyse, Lyse durch Gefriertrocknen, Lyse durch osmotischen Schock, Mikrowellen- und/oder Temperaturbehandlung, und/oder Kombinationen davon zur Lyse biologischer Probe geeignet. Bevorzugt erfolgt die Lyse in Gegenwart chaotroper Salze.

[0086] Vorzugsweise erfolgt ein Lysieren der biologischen Probe in Gegenwart einer Lysezusammensetzung umfassend wenigstens eine chaotrope Verbindung und wenigstens ein polyoxyethylen-basiertes nicht-ionisches Tensid ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen-Fettalkoholether, Polyoxyethylen-Alkylphenylether und/oder Polyoxyethylen-Polyoxypropylen Blockcopolymere im Bereich von $\geq 0,1\%$ (Gewicht/Volumen) bis $\leq 50\%$ (Gewicht/Volumen), bezogen auf das Gesamtvolumen der Lysezusammensetzung.

[0087] Insbesondere ist eine Kombination aus Chaotropen und polyoxyethylen-basiertem nicht-ionischen Tensid ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen-Fettalkoholether, Polyoxyethylen-Alkylphenylether und/oder Polyoxyethylen-Polyoxypropylen Blockcopolymere für die Lyse von Virenzellen besonders effektiv.

[0088] Die Lyse- und/oder Bindezusammensetzung umfasst wenigstens eine chaotrope Verbindung, und wenigstens ein polyoxyethylen-basiertes nicht-ionisches Tensid ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen-Fettalkoholether, Polyoxyethylen-Alkylphenylether und/oder Polyoxyethylen-Polyoxypropylen Blockcopolymere.

[0089] Es wird hierbei für die polyoxyethylen-basierten nicht-ionischen Tenside in vollem Umfang auf die vorstehende Beschreibung Bezug genommen.

[0090] Beispiele für geeignete ethoxylierte Fettalkohole sind ethoxylierte Dodecyl-, Lauryl-, Cetyl-, Oleyl- oder Stearylalkohole, die allein oder im Gemisch verwendbar sind. Bevorzugte Polyoxyethylen-Fettalkoholether sind ethoxylierte Lauryl-, Cetyl-, Oleyl- oder Stearylalkohole ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylenlaurylether, Polyoxyethylencetyl-, Polyoxyethylenstearylether und/oder Polyoxyethylenoleylether.

[0091] Bevorzugte Polyoxyethylen-Fettalkohole-

ther sind ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen(4)laurylether, Polyoxyethylen(23)laurylether, Polyoxyethylen(2)cetylether, Polyoxyethylen(10)cetylether, Polyoxyethylen(20)cetylether, Polyoxyethylen(2)stearylether, Polyoxyethylen(10)stearylether, Polyoxyethylen(20)stearylether, Polyoxyethylen(2)oleylether, Polyoxyethylen(10)oleylether, Polyoxyethylen(20)oleylether und/oder Polyoxyethylen(100)stearylether. Hierbei geben die Zahlen die durchschnittliche Anzahl der Ethylenoxid-Einheiten an.

[0092] Beispiele geeigneter Polyoxyethylen-Lauryl-, -Cetyl-, -Oleyl- oder - Stearylalkoholether sind vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen(4)laurylether (Brij[®] 30) oder Polyoxyethylen(23)laurylether (Brij[®] 35), Polyoxyethylen(2)cetylether (Brij[®] 52), Polyoxyethylen(10)cetylether (Brij[®] 56), Polyoxyethylen(20)cetylether (Brij[®] 58), Polyoxyethylen(2)stearylether (Brij[®] 72), Polyoxyethylen(10)stearylether (Brij[®] 76), Polyoxyethylen(20)stearylether (Brij[®] 78), Polyoxyethylen(2)oleylether (Brij[®] 92), Polyoxyethylen(10)oleylether (Brij[®] 97), Polyoxyethylen(20)oleylether (Brij[®] 98) und/oder Polyoxyethylen(100)stearylether (Brij[®] 700).

[0093] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst der Polyoxyethylen-Fettalkoholether einen Fettalkohol-Bestandteil, der 6 bis 22 Kohlenstoffatome aufweist, und einen Polyoxyethylen-Bestandteil, der 2 bis 150 (CH₂CH₂O)-Einheiten enthält.

[0094] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens ist der Polyoxyethylen-Fettalkoholether ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylenlaurylether, Polyoxyethylenlencetylether, Polyoxyethylenstearylether und/oder Polyoxyethylenoleylether.

[0095] In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens ist der Polyoxyethylen-Fettalkoholether ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylenlencetylether, Polyoxyethylenstearylether und/oder Polyoxyethylenoleylether. In dieser Ausführungsform sind Laurylalkoholether des Polyoxyethylens, beispielsweise Polyoxyethylen(4)laurylether (Brij[®] 30) oder Polyoxyethylen(23)laurylether (Brij[®] 35) weniger bevorzugt in der Lyse- und/oder Bindezusammensetzung umfasst. Vorzugsweise enthalten die Lyse- und/oder Bindezusammensetzung daher keine dieser Substanzen. In einer besonderen bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Polyoxyethylen-Fettalkoholether der Lyse- und/oder Bindezusammensetzung nicht um Polyoxyethylenlaurylether.

[0096] Bevorzugt sind Polyoxyethylen-Cetyl-, Oleyl- oder Stearylalkoholether, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen(10)cetylether (Brij[®] 56), Polyoxyethylen(20)cetylether (Brij[®]

58), Polyoxyethylen(20)stearylether (Brij[®] 78) und/oder Polyoxyethylen(20)oleylether (Brij[®] 98). Besonders bevorzugt sind Polyoxyethylen-Cetyl- oder Oleylalkoholether, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen(10)cetylether (Brij[®] 56), Polyoxyethylen(20)cetylether (Brij[®] 58) und/oder Polyoxyethylen(20)oleylether (Brij[®] 98).

[0097] Weiterhin geeignet sind polyethoxylierte Lauryl-, Cetyl-, Stearyl- oder Oleylalkohole, die beispielsweise unter den INCI-Bezeichnungen Laureth, Ceteth, Steareth oder Oleth erhältlich sind.

[0098] Weiter bevorzugte polyoxyethylen-basierte nicht-ionische Tensidien sind Polyoxyethylenalkylphenylether. Vorzugsweise weisen Polyoxyethylenalkylphenylether eine Alkylgruppe mit fünf bis 15 Kohlenstoffatomen, bevorzugt mit 6 bis 10 Kohlenstoffatomen, auf. Weiter bevorzugt sind verzweigte oder unverzweigte C₇- bis C₁₀-Alkylgruppen, insbesondere verzweigte oder unverzweigte C₈- und C₉-Alkylgruppen, besonders bevorzugt Isooctyl- und Nonyl-Gruppen. In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens ist der Polyoxyethylenalkylphenylether ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen-nonylphenylether und/oder Polyoxyethylenisooctylphenylether. Geeignete Polyoxyethylen-nonylphenylether und Polyoxyethylenisooctylphenylether sind beispielsweise erhältlich unter der Handelsbezeichnung Igepal[®], beispielsweise von der Firma BASF.

[0099] Weiter bevorzugte polyoxyethylen-basierte nicht-ionische Tensidien sind Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Blockcopolymere. Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Blockcopolymere werden auch als "Ploxamer" bezeichnet. Bevorzugt sind Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Blockcopolymere der Summenformel HO(C₂H₄O)_a(C₃H₆O)_b(C₂H₄O)_aH, wobei "a" die der Zahl der Polyoxyethylen- und "b" die der Zahl der Polyoxypropyleneinheiten bezeichnet und das Gewichtsverhältnis a/b vorzugsweise im Bereich von 0,1 bis 3 liegt.

[0100] "a" liegt insbesondere im Bereich von 2 bis 150, bevorzugt von 4 bis 120, weiter bevorzugt von 8 bis 80, noch weiter bevorzugt beträgt "a" eine ganze Zahl ausgewählt aus 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 oder 150, und am meisten bevorzugt beträgt "a" eine ganze Zahl ausgewählt aus 2, 4, 10, 20, 23, 40, 55,

70 oder 100.

[0101] "b" liegt insbesondere im Bereich von 10 bis 90, bevorzugt im Bereich von 20 bis 80, weiter bevorzugt im Bereich von 30 bis 70, noch weiter bevorzugt beträgt "b" eine ganze Zahl ausgewählt aus 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 oder 90, und am meisten bevorzugt beträgt "b" eine ganze Zahl ausgewählt aus 15, 18, 23, 40, 55, 67 oder 75.

[0102] Weiter bevorzugt sind Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Blockcopolymeren mit verschiedener Länge der Polyoxyethylen- und Polyoxypropylenblöcke, bei denen ein Polyoxypropylenblock mit 15 bis 67 Polypropyleneinheiten von zwei Polyoxyethylenblöcken mit unabhängig voneinander je 2 bis 130 Polyethyleneneinheiten eingeschlossen ist

[0103] Geeignete Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Blockcopolymeren sind beispielsweise erhältlich unter der Handelsbezeichnung Pluronic® oder Synperonic®, beispielsweise von der Firma BASF.

[0104] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens umfasst die Lyse- und/oder Bindezusammensetzung nicht-ionisches Tensid im Bereich von $\geq 0,2\%$ (Gewicht/Volumen) bis $\leq 30\%$ (Gewicht/Volumen), vorzugsweise im Bereich von $\geq 3\%$ (Gewicht/Volumen) bis $\leq 10\%$ (Gewicht/Volumen), bevorzugt im Bereich von $\geq 3,2\%$ (Gewicht/Volumen) bis $\leq 8\%$ (Gewicht/Volumen), bezogen auf das Gesamtvolumen der Zusammensetzung.

[0105] Dies hat sich insbesondere für Lysezusammensetzungen und für Mischungen von Lyse- und Bindezusammensetzungen als günstig herausgestellt.

[0106] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens ist die chaotrope Verbindung der Lyse- und/oder Bindezusammensetzung ein Natrium- oder Guanidiniumsalz, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Natriumiodid, Natriumperchlorat, Guanidiniumhydrochlorid, Guanidiniumthiocyanat, Guanidiniumisothiocyanat und/oder eine Mischung zweier oder mehrerer Salze davon. Bevorzugt ist die chaotrope Verbindung ein Guanidiniumsalz, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Guanidiniumhydrochlorid, Guanidiniumthiocyanat und/oder Guanidiniumisothiocyanat.

[0107] Insbesondere hat sich eine Kombination der vorgenannten chaotropen Verbindungen und der erfindungsgemäß enthaltenen polyoxyethylen-basierten nicht-ionischen Tensidien für die Lyse von Virus-

zellen und die Isolierung von Nukleinsäuren aus Viruszellen als günstig erwiesen.

[0108] Konzentrationen der chaotropen Verbindung der Lyse- und/oder Bindezusammensetzung im Bereich von $\geq 0,1$ M bis ≤ 10 M haben sich als günstig erwiesen. Vorzugsweise liegt die Konzentrationen der chaotropen Verbindung im Bereich von ≥ 1 M bis ≤ 8 M, bevorzugt im Bereich von ≥ 3 M bis ≤ 7 M, besonders bevorzugt im Bereich von ≥ 4 M bis ≤ 6 M.

[0109] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens umfasst die Lyse- und/oder Bindezusammensetzung wenigstens eine Pufferverbindung ausgewählt aus der Gruppe umfassend Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin (Tricin), N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-glycin (BICIN), N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES), Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure) (PIPES), N-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure (CHES), 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES), 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) und/oder Phosphatpuffer.

[0110] Gemäß einer weiter bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens umfasst die Lyse- und/oder Bindezusammensetzung wenigstens eine Pufferverbindung ausgewählt aus der Gruppe umfassend Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES), und/oder Phosphatpuffer. Gemäß einer noch weiter bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens umfasst die Lyse- und/oder Bindezusammensetzung wenigstens eine Pufferverbindung ausgewählt aus der Gruppe umfassend Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) und/oder N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES).

[0111] Das Lysieren der biologischen Probe kann bei Raumtemperatur beispielsweise bei 15°C bis 25°C oder bei erhöhter Temperatur, beispielsweise bei Temperaturen im Bereich von $\geq 37^{\circ}\text{C}$ bis $\leq 75^{\circ}\text{C}$ erfolgen.

[0112] In bevorzugten Ausführungsformen kann die Lysezusammensetzung weiterhin Enzyme aufweisen, beispielsweise Proteinase K, Protease (z. B. QIAGEN-Protease), Zymolase, Lyticase, Achromopeptidase, Lysostaphin, Lysozym, und, je nach Anwendung Nukleasen, zum Beispiel DNase und/oder RNase.

[0113] Das Immobilisieren der freigesetzten Nukleinsäure(n) an einer Matrix auf Basis einer oder mehrerer Siliciumoxidverbindung erfolgt in Gegenwart einer chaotropen Verbindung und/oder eines verzweigten oder unverzweigten Alkohols.

[0114] Vorzugsweise umfasst die Bindezusammensetzung ein verzweigtes oder unverzweigtes Alkanol.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist das verzweigte oder unverzweigte Alkanol ein Alkohol mit einem bis fünf Kohlenstoffatomen, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Methanol, Ethanol, Isopropanol, n-Propanol, n-Butanol, iso-Butanol, sec-Butanol, tert-Butanol, n-Pentanol, iso-Pentanol und/oder Mischungen davon.

[0115] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Bindezusammensetzung verzweigtes oder unverzweigtes Alkanol im Bereich von ≥ 1 Vol.-% bis ≤ 80 Vol.-%, vorzugsweise im Bereich von ≥ 5 Vol.-% bis ≤ 70 Vol.-%, bevorzugt im Bereich von ≥ 10 Vol.-% bis ≤ 60 Vol.-%, weiter vorzugsweise im Bereich von ≥ 15 Vol.-% bis ≤ 50 Vol.-%, bezogen auf das Gesamtvolumen der Bindezusammensetzung.

[0116] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst eine Mischung der Bindezusammensetzung das Lyseagens und optional ein oder mehrere weitere Zusätze bevorzugt verzweigtes oder unverzweigtes Alkanol im Bereich von ≥ 1 Vol.-% bis ≤ 80 Vol.-%, vorzugsweise im Bereich von ≥ 5 Vol.-% bis ≤ 70 Vol.-%, bevorzugt im Bereich von ≥ 15 Vol.-% bis ≤ 50 Vol.-%, bezogen auf das Gesamtvolumen der Mischung.

[0117] Zur Isolierung der Nukleinsäuren wird die Probe mit einer Matrix auf Basis einer oder mehrerer Siliciumoxidverbindungen, wie Siliziumdioxid (Silica), Silicat, Glas und/oder Silicagel in Kontakt gebracht und für eine für die Bindung ausreichende Zeit inkubiert. Die Matrix kann in den üblichen aus dem Stand der Technik bekannten Ausgestaltungen vorliegen wie zum Beispiel in Form von Partikeln, als Membran oder Filter. Zur leichteren Abtrennung weisen die Partikel vorzugsweise magnetische Eigenschaften auf. Für Nukleinsäuren können Inkubationszeiten zwischen 10 Sekunden und 30 Minuten zweckmäßig sein. Es haben sich Inkubationszeiten in einem Bereich von 1 Minute bis 20 Minuten, insbesondere von ca. 10 Minuten als vorteilhaft erwiesen.

[0118] Zum Isolieren von Nukleinsäuren werden bevorzugt magnetische Partikel verwendet, die eine Kieselgelhülle aufweisen. Zum Isolieren von Nukleinsäuren werden bevorzugt magnetische Partikel verwendet, die eine Kieselgelhülle aufweisen und die eine mittlere Partikelgröße im Bereich von ≥ 1 μm bis ≤ 25 μm , vorzugsweise im Bereich von ≥ 5 μm bis ≤ 15 μm und besonders bevorzugt im Bereich von ≥ 6 μm bis ≤ 10 μm , vorzugsweise mit einer engen Größenverteilung, aufweisen. Zum Isolieren von Nukleinsäuren werden weiter bevorzugt magnetische Partikel verwendet, die eine Kieselgelhülle aufweisen und die eine mittlere Partikelgröße im Bereich von ≥ 1 μm bis ≤ 5 μm , vorzugsweise mit einer engen Größenverteilung, aufweisen.

[0119] In einer weiter bevorzugten Ausführungs-

form sind die magnetischen oder magnetisch anziehbaren Partikel, die einen magnetischen auf Eisenoxid basierenden Kern, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Magnetit (Fe_3O_4), Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) und/oder Ferriten, aufweisen.

[0120] Magnetische Silicapartikel, die in vorteilhafter Weise verwendet werden können, sind beispielsweise in der internationalen Patentanmeldung WO 01/71732 beschrieben, worauf hiermit vollumfänglich Bezug genommen wird.

[0121] In einer bevorzugten Ausführungsform ist eine Matrix auf Basis einer oder mehrerer Siliciumoxidverbindungen in Form magnetischer oder magnetisch anziehbarer Partikel mit einer Silica-Oberfläche verwendbar.

[0122] Vorzugsweise erfolgt die Bindung bei Temperaturen im Bereich von $\geq 15^\circ\text{C}$ bis $\leq 75^\circ\text{C}$, bevorzugt im Bereich von $\geq 20^\circ\text{C}$ bis $\leq 70^\circ\text{C}$, besonders bevorzugt im Bereich von $\geq 46^\circ\text{C}$ bis $\leq 65^\circ\text{C}$ am meisten bevorzugt von $\geq 50^\circ\text{C}$ bis $\leq 60^\circ\text{C}$. Die Bindung kann auch bei Raumtemperatur beispielsweise bei $\geq 15^\circ\text{C}$ bis $\leq 28^\circ\text{C}$ erfolgen.

[0123] Nach der Inkubation werden die an die Matrix auf Basis einer oder mehrerer Siliciumoxidverbindungen gebundenen Nukleinsäuren von der Lyse- und/oder Bindezusammensetzung abgetrennt. Bei Verwendung von magnetischen Silicapartikeln kann dies mit Hilfe eines Magnetfeldes erreicht werden. Beispielsweise können die Magnetpartikel an die Wand des Gefäßes, in dem die Inkubation stattgefunden hatte, gezogen werden, in geeigneten Pipettenspitzen durch Anlegen eines Magnetfeldes gesammelt werden, oder an durch Kunststoffhüllen geschützten Magnetstäben immobilisiert werden. Geeignete Verfahrensschritte zum Entfernen der Lyse- und/oder Bindezusammensetzung sind beispielsweise Abpipettieren oder Absaugen der Flüssigkeit, oder das Herausheben der Magnetpartikel in Pipettenspitzen oder an Magnetstäben bzw. das Absenken des Lyse- und/oder Bindeansatzes wobei die separierten Magnetpartikel auf gleicher Höhe verbleiben.

[0124] Optional können die auf der Matrix immobilisierten Nukleinsäure(n) vor dem Abtrennen gewaschen werden. Der Waschschriff findet bevorzugt durch Inkubation einer Waschlösung mit den beladenen Partikeln statt, wobei bevorzugt eine Resuspension der Partikel erfolgt, beispielsweise durch Schütteln oder Anlegen eines Magnetfeldes. Die verunreinigte Waschlösung wird vorzugsweise ebenso wie die nach der Bindung verbleibende Lyse- und/oder Bindezusammensetzung, insbesondere ein Gemisch von Lyse- und/oder Bindezusammensetzung entfernt.

[0125] Als Waschreagenz kann ein herkömmlicher

Waschpuffer oder jedes andere, geeignete Medium verwendet werden. Im Allgemeinen werden Waschreagenzien mit niedriger bis moderater Innenstärke bevorzugt, beispielsweise eine Lösung von 10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS). Weiterhin sind Waschpuffer, die höhere Konzentrationen an Salzen aufweisen beispielsweise eine Lösung von 4–6 M Guanidinium-Hydrochlorid verwendbar. Die zuvor beschriebenen erfindungsgemäßen Waschreagenzien stellen ebenfalls geeignete Waschreagenzien dar.

[0126] Weiterhin sind alkoholhaltige Waschreagenzien verwendbar, beispielsweise wässrige Lösungen von Alkoholen mit eins bis fünf Kohlenstoffatomen, bevorzugt wässrige Lösungen von Ethanol, insbesondere wässrige Lösungen von 50–100 prozentigem Ethanol.

[0127] Vorzugsweise werden die auf der Matrix immobilisierten Nukleinsäure(n) mehrmals beispielsweise 2fach bis 4fach, gewaschen, bevorzugt mit verschiedenen Waschreagenzien. In bevorzugten Ausführungsformen erfolgt das Waschen zunächst mit Waschreagenzien mit niedriger bis moderater Innenstärke, und anschließend mit einer wässrigen 70–100 prozentigen Lösung von Ethanol.

[0128] Insbesondere eine Verwendung magnetischer Partikel ermöglicht eine einfache Durchführung von Separations- und/oder Waschschrritten durch die magnetische Aggregation der Partikel.

[0129] Im Anschluss an den letzten Waschschrtritt oder einem Wasserspülschrtritt („water rinse“) kann ein Trocknungsschrtritt der vorzugsweise magnetischen Partikel beispielsweise im Vakuum oder durch Ausdampfen oder Ausdampfen lassen der Flüssigkeit vorgenommen werden.

[0130] Gemäß Schritt d) des Verfahrens können die gebundenen Nukleinsäuren von der Matrix abgetrennt werden. Das Abtrennen der Nukleinsäuren wird auch als Eluieren bezeichnet.

[0131] Es kann auch bevorzugt sein, die an die Matrix insbesondere an magnetische Partikel gebundenen Nukleinsäuren ohne Abtrennung zu verwenden, beispielsweise für PCR oder anderen Amplifikationsmethoden, DNA-Detektionsverfahren oder DNA-Identifikationsverfahren.

[0132] Die gebundene Nukleinsäure kann mittels eines Elutionsreagenz mit niedrigem Salzgehalt von den Partikeln abgetrennt werden. Als Elutionsreagenz mit niedrigem Salzgehalt sind insbesondere Reagenzien mit einem Salzgehalt von weniger als 0,1 mol/l verwendbar. Besonders bevorzugt enthält das Elutionsreagenz die Pufferverbindung Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris). Weiterhin beson-

ders geeignet zur Elution ist demineralisiertes Wasser, optional mit einem oder mehreren Zusätzen, beispielsweise Komplexbildner wie Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA), Azid und/oder Pufferverbindungen beispielsweise Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris).

[0133] Insbesondere durch Verwendung der Lyse- und/oder Bindezusammensetzung ergibt sich ein besonders vorteilhaftes Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Proben, insbesondere zur Isolierung von Virus-DNA.

[0134] Vorteile ergeben sich insbesondere aus den erzielbaren guten Ausbeuten auch nach Lagerung der Lyse- und/oder Bindereagenzien.

[0135] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Kit zur Isolierung und/oder Reinigung von Nukleinsäuren aus einer Nukleinsäuren enthaltenden biologischen Probe, umfassend ein erfindungsgemäßes Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz.

[0136] In bevorzugten Ausführungsformen kann das Kit weiterhin eine Matrix auf Basis einer oder mehrerer Siliciumoxidverbindung enthalten, insbesondere eine Matrix auf Basis einer oder mehrerer Siliciumoxidverbindung in Form magnetischer oder magnetisch anziehbarer Partikel mit einer Silica-Oberfläche. Bevorzugt enthaltene magnetische Silicapartikel, sind beispielsweise in der internationalen Patentanmeldung WO 01/71732 beschrieben, auf die hiermit vollumfänglich Bezug genommen wird.

[0137] In einer weiter bevorzugten Ausführungsform kann das Kit weiterhin geeignete Wasch- und/oder Elutionsreagenzien enthalten, insbesondere erfindungsgemäßes Waschreagenz.

[0138] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann das Kit statt magnetischen Silikapartikeln andere silanisierte Träger-Materialien bevorzugt Zentrifugensäulchen mit Silika-Membranen enthalten.

[0139] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von polyoxyethylen-basierten nicht-ionischen Tensiden ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen-Fettalkoholether, Polyoxyethylen-Alkylphenylether und/oder Polyoxyethylen-Polyoxypropylen Blockcopolymere insbesondere Polyoxyethylen-Fettalkoholethern ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylenlaurylether, Polyoxyethylencetylether, Polyoxyethylenstearylether und/oder Polyoxyethylenoleylether zur Solubilisierung von Lipiden einer biologischen Probe.

[0140] Unter dem Begriff „Lipid“ sind im Sinne der vorliegenden Erfindung wasserunlösliche oder zumindest größtenteils wasserunlösliche Naturstoffe zu verstehen. Der Begriff „Lipid“ umfasst im Sinne der

vorliegenden Erfindung Fettsäuren, die Gruppe der Triglyceride umfassend Fette und Öle, Wachse, Phospholipide, Sphingolipide, Liposaccharide und die Gruppe der Isoprenoide umfassend Steroide und Carotinoide. Insbesondere sind unter dem Begriff "Lipid" Lipidbestandteile oder Strukturkomponenten der Zellmembranen von Organismen wie Phospholipide und Sphingolipide zu verstehen.

[0141] Bevorzugt ist eine Verwendung von polyoxyethylen-basierten nicht-ionischen Tensiden ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen-Fettalkoholether, Polyoxyethylen-Alkylphenylether und/oder Polyoxyethylen-Polyoxypropylen Blockcopolymere zur Solubilisierung von Lipiden einer biologischen Probe bei Verfahren zur Isolierung und/oder Reinigung von Nukleinsäuren aus einer Nukleinsäuren enthaltenden biologischen Probe.

[0142] Es wird hierbei für die polyoxyethylen-basierten nicht-ionischen Tensiden in vollem Umfang auf die vorstehende Beschreibung Bezug genommen.

[0143] Insbesondere bevorzugt ist eine Verwendung von Polyoxyethylen-Fettalkoholethern ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylenlaurylether, Polyoxyethylencetylether, Polyoxyethylenstearylether und/oder Polyoxyethylenoleylether zur Solubilisierung von Lipiden einer biologischen Probe bei Verfahren zur Isolierung und/oder Reinigung von Nukleinsäuren aus einer Nukleinsäuren enthaltenden biologischen Probe.

[0144] Besonders bevorzugt ist eine Verwendung der polyoxyethylen-basierten nicht-ionischen Tensiden insbesondere Polyoxyethylen-Fettalkoholethern zur Solubilisierung von Lipiden einer biologischen Probe bei Verfahren zur Isolierung und/oder Reinigung von Nukleinsäuren unter Verwendung einer Matrix auf Basis einer oder mehrerer Siliciumoxidverbindung vorzugsweise in Form magnetischer oder magnetisch anziehbarer Partikel mit einer Silica-Oberfläche.

[0145] In vorteilhafter Weise konnte festgestellt werden, dass bei einer Verwendung der polyoxyethylen-basierten nicht-ionischen Tensiden insbesondere Polyoxyethylen-Fettalkoholethern bei Verfahren zur Isolierung und/oder Reinigung von Nukleinsäuren unter Verwendung einer Matrix auf Basis einer oder mehrerer Siliciumoxidverbindung vorzugsweise in Form magnetischer oder magnetisch anziehbarer Partikel mit einer Silica-Oberfläche keine oder zumindest deutlich weniger Verunreinigungen im Eluat enthalten waren.

[0146] Darüber hinaus ist die Erfindung gerichtet auf die Verwendung von polyoxyethylen-basierten nicht-ionischen Tensiden ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen-Fettalkoholether, Poly-

xyethylen-Alkylphenylether und/oder Polyoxyethylen-Polyoxypropylen Blockcopolymere, vorzugsweise Polyoxyethylen-Fettalkoholether ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylenlaurylether, Polyoxyethylencetylether, Polyoxyethylenstearylether und/oder Polyoxyethylenoleylether, zur Herstellung lagerstabiler Binde-, Lyse- und/oder Waschreagenzien.

[0147] Es wird hierbei für die polyoxyethylen-basierten nicht-ionischen Tenside in vollem Umfang auf die vorstehende Beschreibung Bezug genommen.

[0148] Unter „lagerstabil“ ist dabei im Sinne der Erfindung vorzugsweise zu verstehen, dass sich die für die jeweilige Anwendung relevanten Eigenschaften des Lyse-, Bindungs- oder Waschreagenzes bei Lagerung in einem Zeitraum von drei Monaten, vorzugsweise von 6 Monaten, weiter bevorzugt von mindestens 8 Monaten nicht derart ändern, dass die Anwendung dadurch wesentlich beeinträchtigt wird. In einer bevorzugten Ausführungsform zeigt sich die Lagerstabilität bei Raumtemperatur, weiter bevorzugt auch bei einer erhöhten Lagertemperatur von beispielsweise 50°C.

[0149] Als eine der relevanten Eigenschaften der Reagenzien für die Anwendung hat sich der pH-Wert herausgestellt. Vorzugsweise ändert sich dieser daher bei der Lagerung der Reagenzien nicht wesentlich, bevorzugt wird der pH-Wert bei der Lagerung der Reagenzien um weniger als 1 abgesenkt.

[0150] Weitere Einzelheiten, Merkmale und Vorteile des Gegenstandes der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen sowie aus der nachfolgenden Beschreibung der zugehörigen Figuren und Beispiele, in denen beispielhaft Ausführungsbeispiele der vorliegenden Erfindung dargestellt sind.

[0151] [Fig. 1a](#), [Fig. 1b](#) zeigt die Änderung des pH-Wertes des erfindungsgemäßen Lysereagenzes B, dargestellt als ungefüllte Balken, und des Tween 20®-haltigen Lysereagenzes A, dargestellt als gefüllte Balken, während 33 Wochen Lagerung bei 25°C ([Fig. 1a](#)) und 50°C ([Fig. 1b](#)).

[0152] [Fig. 2](#) zeigt die Mittelwerte der CT-Werte nach HBV-spezifischer real-time-PCR von HBV-DNA nach Durchführung von Präparationen viraler DNA mit dem erfindungsgemäßen Lysereagenz B und dem Tween® 20-haltigen Lysereagenz A.

[0153] [Fig. 3](#) zeigt die Mittelwerte der CT-Werte nach HBV-spezifischer real-time-PCR von HBV-DNA nach Durchführung von Präparationen viraler DNA mit dem erfindungsgemäßen Lysereagenz B und dem Tween® 20-haltigen Lysereagenz A nach 10 Wochen Lagerung bei 50°C. Hierbei diente ein Lysereagenz A, das etwa 4 Wochen bei Raumtemperatur ge-

lagert wurde, als Referenz. Es wurden jeweils 6 µl und 24 µl des Eluats für die real-time-PCR verwendet, wobei die Ergebnisse für 6 µl des Eluats dargestellt sind als ungefüllte Balken und die für 24 µl Eluat dargestellt sind als gefüllte Balken.

[0154] Die Erfindung wird nachfolgend ebenfalls anhand von Beispielen erläutert. Es versteht sich, dass diese rein illustrativ zu betrachten sind und keine Einschränkung der vorliegenden Erfindung darstellen sollen.

Beispiel 1: Stabilitätsuntersuchung

[0155] Ein Lysereagenz A enthaltend 20% (w/v) Tween® 20 (Fa. Fluka), Guanidiniumisothiocyanat und Tris(hydroxymethyl)aminomethan und Lysereagenz B, bei dem das Tween® 20 durch 20% (w/v) Brij® 58 (Fa. Sigma) ausgetauscht wurde, wurden in bidestilliertem Wasser frisch angesetzt und jeweils in geschlossenen Gefäßen für 33 Wochen bei 25°C und 50°C gelagert.

[0156] Hierbei wurde zum Zeitpunkt der Einlagerung sowie in wöchentlichen Intervallen jeweils der pH-Wert der Lösungen mit Hilfe eines pH-Meters (Firma Metrohm) bei Temperaturen im Bereich von 20°C bis 28°C bestimmt.

[0157] Anhand des in [Fig. 1a](#) dargestellten Balkendiagramms ist ersichtlich, dass der pH-Wert des Lysereagenzes A während 33 Wochen Lagerung bei 25°C von ca. pH 7,8 zu pH 7,2 leicht abnahm, während der pH-Wert während 33 Wochen Lagerung bei 50°C von ca. pH 7,8 zu ca. pH 5,9 abnahm, wie in [Fig. 1b](#) dargestellt ist. Demgegenüber blieb der pH-Wert des Lysereagenzes B während der 33 Wochen Lagerung bei 25°C und 50°C stabil bei ca. pH 8.

Beispiel 2: Extraktion viraler DNA

[0158] Negatives, d. h. HBV-Virus-freies, Humanplasma wurde mit 10⁴ sgU/ml Hepatitis-B-Virus (HBV) versetzt. Aus jeweils 1000 µl der Plasmaprobe wurde die virale DNA unter Verwendung der kommerziell erhältlichen Automationsplattform QIASymphony® (Fa. Qiagen) mittels des automatisierten Protokolls zur Aufreinigung von viraler Nukleinsäure aus Plasmaproben extrahiert.

[0159] Gemäß dem verwendeten Protokoll wurde die Probe mit den im Protokoll definierten Volumina – an Lysereagenz B enthaltend Guanidiniumisothiocyanat, Tris(hydroxymethyl)aminomethan und 20% (w/v) Brij® 58 (Fa. Sigma) und Proteinase K und Lösung AVE enthaltend Carrier-RNA in Kontakt gebracht. Es erfolgte eine Inkubation bei 65°C zur Lyse der Probe. Anschließend wurde dem Probenansatz das im Protokoll definierte Volumen an Bindereagenz C enthaltend Guanidiniumisothiocyanat, Tris(hydro-

xymethyl)aminomethan und 9% (w/v) Brij® 58 (Fa. Sigma) sowie Isopropanol zugegeben. Nach einer weiteren 3 minütigen Inkubation wurde MagAttract Suspension, welche die magnetischen Siliciumoxid-Partikel enthielt, zugegeben und wie im Protokoll vorgesehen vermischt. Während dieser Zeit binden die Nukleinsäuren an die Siliciumoxid-Partikel. Anschließend wurden die magnetischen Siliciumoxid-Partikel separiert und die flüssige Phase entfernt. Zu den Siliciumoxid-Partikeln wurden anschließend das im Protokoll definierte Volumen an Waschlösung enthaltend Guanidiniumthiocyanat und Ethanol zugegeben und die Partikel in der Waschlösung suspendiert. Es erfolgte erneutes Entfernen des Überstandes sowie Zugabe von im Protokoll definiertem Volumen an Waschlösung enthaltend Tris, NaCl und Ethanol und ein zweiter Waschschrift. Nach dem Separieren und Abtrennen der flüssigen Phase wurden die Partikel mit im Protokoll definierte Volumen an wässrigem 80%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Separieren der Partikel wurde der Überstand entfernt und es erfolgte Lufttrocknen der Partikel für 8 Minuten. Um die DNA zu eluieren wurden im Protokoll definierte Volumen an Elutionslösung E zugegeben und die Partikel für 3 Minuten darin suspendiert. Anschließend wurden die Partikel entfernt und das Eluat erhalten.

[0160] Gemäß diesem Protokoll wurde aus einer weiteren 1000 µl Plasmaprobe virale DNA extrahiert, wobei abweichend Lysereagenz A enthaltend 20% (w/v) Tween® 20 (Fa. Fluka) und Bindereagenz D enthaltend 9% (w/v) Tween® 20 (Fa. Fluka) verwendet wurden.

[0161] Die erhaltenen Eluate wurden jeweils einer HBV-spezifischen real-time (RT)-PCR unterzogen, wobei jeweils 24 µl Eluat verwendet wurden. Aus den in [Fig. 2](#) dargestellten Mittelwerten der CT-Werte (Threshold Cycle, "Schwellenwert-Zyklus"), die den Zyklus beschreiben, an dem die Fluoreszenz beginnt logarithmisch zuzunehmen, ist erkennbar, dass die Extraktion unter Verwendung des erfindungsgemäßen Lysereagenzes B und Bindereagenzes C eine höhere Ausbeute erzielte.

Beispiel 3: Extraktion viraler DNA nach Lagerung des Lysereagenzes

[0162] Die Lysereagenzien B enthaltend Guanidiniumisothiocyanat, Tris(hydroxymethyl)aminomethan und 20% (w/v) Brij® 58 (Fa. Sigma) und A, in dem das Brij® 58 durch 20% (w/v) Tween® 20 (Fa. Fluka) ausgetauscht war, wurden jeweils in geschlossenen Gefäßen für 10 Wochen bei 50°C gelagert.

[0163] Anschließend wurde unter Verwendung der kommerziell erhältlichen Automationsplattform QIASymphony® (Fa. Qiagen) mittels des automatisierten Protokolls zur Aufreinigung von viraler Nukleinsäure aus Plasmaproben die virale Nukleinsäure extrahiert.

[0164] Gemäß dem in Beispiel 2 beschriebenen Protokoll wurde aus jeweils 1000 µl der Plasmaprobe die virale DNA unter Verwendung der kommerziell erhältlichen Automationsplattform QIA Symphony® (Fa. Qiagen) extrahiert, wobei für unterschiedliche Ansätze jeweils für 10 Wochen bei 50°C gelagerter Lysereagenz B enthaltend Guanidiniumisothiocyanat, Tris(hydroxymethyl)aminomethan und 20% (w/v) Brij® 58 (Fa. Sigma) und Lysereagenz A, in dem das Brij® 58 durch 20% (w/v) Tween® 20 (Fa. Fluka) ausgetauscht war. Als Referenz diente ein Lysereagenz A, der etwa 4 Wochen bei Raumtemperatur gelagert wurde.

[0165] Es wurde festgestellt, dass die Eluate, die unter Verwendung des bei 50°C gelagerten Lysereagenzes A erhalten wurden, stark getrübt waren, während die Eluate, die unter Verwendung des Lysereagenzes B erhalten wurden, klar waren.

[0166] Von den erhaltenen Eluaten wurden jeweils 6 µl und 24 µl einer HBV-spezifischen real-time(RT)-PCR unterzogen. Aus den in [Fig. 3](#) dargestellten Mittelwerten der CT-Werte ist erkennbar, dass die Extraktion unter Verwendung der erfindungsgemäßen Lysereagenz B und Bindereagenz C eine höhere Ausbeute erzielte.

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

- WO 01/71732 [[0120](#), [0136](#)]

Patentansprüche

1. Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz umfassend:

- wenigstens eine chaotrope Verbindung,
- wenigstens eine Pufferverbindung vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Tris(hydroxymethyl)aminomethan, N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin, N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-glycin, 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure, N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure), Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure), N-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure, 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure und/oder Phosphatpuffer, und
- wenigstens ein polyoxyethylen-basiertes nicht-ionisches Tensid ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen-Fettalkoholether, Polyoxyethylen-Alkylphenylether und/oder Polyoxyethylen-Polyoxypropylen Blockcopolymere im Bereich von $\geq 8\%$ Gewicht/Volumen bis $\leq 50\%$ Gewicht/Volumen, bezogen auf das Gesamtvolumen des Reagenzes.

2. Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Polyoxyethylen-Fettalkoholether einen Fettalkohol-Bestandteil umfasst, der 6 bis 22 Kohlenstoffatome aufweist, und einen Polyoxyethylen-Bestandteil umfasst, der 2 bis 150 (CH₂CH₂O)-Einheiten enthält, wobei der Polyoxyethylen-Fettalkoholether vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylenlaurylether, Polyoxyethylencetylether, Polyoxyethylenstearylether und/oder Polyoxyethylenoleylether.

3. Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Polyoxyethylen-Fettalkoholether nicht um Polyoxyethylenlaurylether handelt.

4. Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Polyoxyethylenalkylphenylether ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen-nonylphenylether und/oder Polyoxyethylenisooctylphenylether.

5. Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz nicht-ionisches Tensid im Bereich von $\geq 9\%$ Gewicht/Volumen bis $\leq 40\%$ Gewicht/Volumen, vorzugsweise im Bereich von $\geq 10\%$ Gewicht/Volumen bis $\leq 30\%$ Gewicht/Volumen, bevorzugt im Bereich von $\geq 15\%$ Gewicht/Volumen bis $\leq 20\%$ Gewicht/Volumen, bezogen auf das Gesamtvolumen des Reagenzes, umfasst.

6. Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die chaotrope Verbindung ein Natri-

um- oder Guanidiniumsalz ist, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Natriumiodid, Natriumperchlorat, Guanidiniumhydrochlorid, Guanidiniumthiocyanat, Guanidiniumisothiocyanat und/oder eine Mischung zweier oder mehrerer Salze davon.

7. Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Bindereagenz ein verzweigtes oder unverzweigtes Alkanol umfasst, bevorzugt einen verzweigten oder unverzweigten Alkohol mit einem bis fünf Kohlenstoffatomen, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Methanol, Ethanol, Isopropanol, n-Propanol, n-Butanol, verzweigtes oder unverzweigtes Butanol oder Pentanol und/oder Mischungen davon.

8. Verwendung eines Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenzes nach einem der vorherigen Ansprüche zur Isolierung und/oder Reinigung von Nukleinsäuren.

9. Verfahren zur Isolierung und/oder Reinigung von Nukleinsäuren aus einer Nukleinsäuren enthaltenden biologischen Probe, umfassend folgende Verfahrensschritte:

- a) Lysieren der biologischen Probe,
- b) Immobilisieren der freigesetzten Nukleinsäure(n) an einer Matrix auf Basis einer oder mehrerer Siliciumoxidverbindung(en) in Gegenwart einer chaotropen Verbindung und/oder eines verzweigten oder unverzweigten Alkanols,
- c) optional Waschen der auf der Matrix immobilisierten Nukleinsäure(n),
- d) optional Abtrennen der gebundenen Nukleinsäure, wobei man das Lysieren und/oder Immobilisieren in Gegenwart einer Lyse- und/oder Bindezusammensetzung durchführt, umfassend:

- wenigstens eine chaotrope Verbindung, und
- wenigstens ein polyoxyethylen-basiertes nicht-ionisches Tensid ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen-Fettalkoholether, Polyoxyethylen-Alkylphenylether und/oder Polyoxyethylen-Polyoxypropylen Blockcopolymere im Bereich von $\geq 0,1\%$ Gewicht/Volumen bis $\leq 50\%$ Gewicht/Volumen, bezogen auf das Gesamtvolumen der Zusammensetzung.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Polyoxyethylen-Fettalkoholether einen Fettalkohol-Bestandteil umfasst, der 6 bis 22 Kohlenstoffatome aufweist, und einen Polyoxyethylen-Bestandteil umfasst, der 2 bis 150 (CH₂CH₂O)-Einheiten enthält, wobei der Polyoxyethylen-Fettalkoholether vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylenlaurylether, Polyoxyethylencetylether, Polyoxyethylenstearylether und/oder Polyoxyethylenoleylether.

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Polyoxyethy-

len-Fettalkoholether nicht um Polyoxyethylenlaurylether handelt.

12. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Lyse- und/oder Bindezusammensetzung nicht-ionisches Tensid im Bereich von $\geq 0,2\%$ Gewicht/Volumen bis $\leq 30\%$ Gewicht/Volumen, vorzugsweise im Bereich von $\geq 3\%$ Gewicht/Volumen bis $\leq 10\%$ Gewicht/Volumen, bevorzugt im Bereich von $\geq 3,2\%$ Gewicht/Volumen bis $\leq 8\%$ Gewicht/Volumen, bezogen auf das Gesamtvolumen der Zusammensetzung, umfasst.

13. Kit zur Isolierung und/oder Reinigung von Nukleinsäuren aus einer Nukleinsäuren enthaltenden biologischen Probe, umfassend ein Lyse-, Binde- und/oder Waschreagenz nach einem der Ansprüche 1 bis 7.

14. Verwendung von polyoxyethylen-basierten nicht-ionischen Tensiden ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen-Fettalkoholether, Polyoxyethylen-Alkylphenylether und/oder Polyoxyethylen-Polyoxypropylen Blockcopolymeren, vorzugsweise Polyoxyethylen-Fettalkoholether ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylenlaurylether, Polyoxyethylencetylether, Polyoxyethylenstearylether und/oder Polyoxyethylenoleylether, zur Solubilisierung von Lipiden einer biologischen Probe.

15. Verwendung von polyoxyethylen-basierten nicht-ionischen Tensiden ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylen-Fettalkoholether, Polyoxyethylen-Alkylphenylether und/oder Polyoxyethylen-Polyoxypropylen Blockcopolymeren, vorzugsweise Polyoxyethylen-Fettalkoholether ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polyoxyethylenlaurylether, Polyoxyethylencetylether, Polyoxyethylenstearylether und/oder Polyoxyethylenoleylether, zur Herstellung lagerstabiler Binde-, Lyse- und/oder Waschreagenzien.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1a

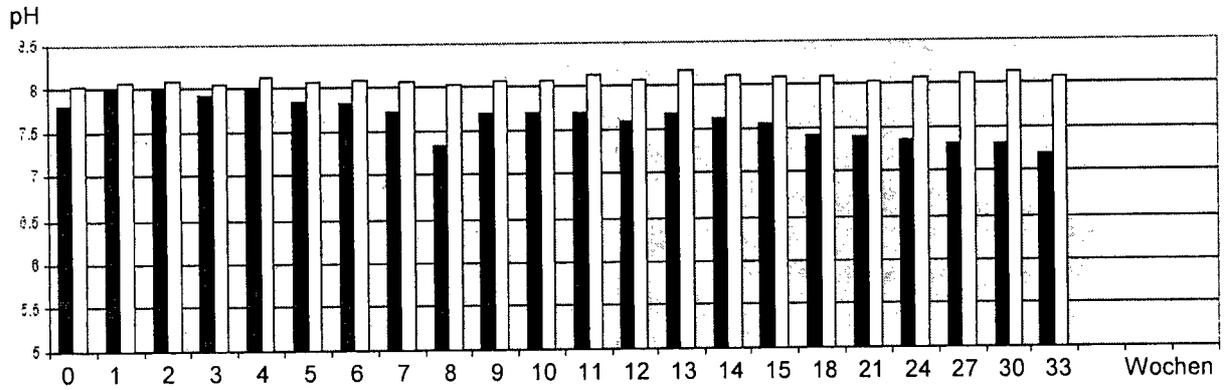


Fig. 1b

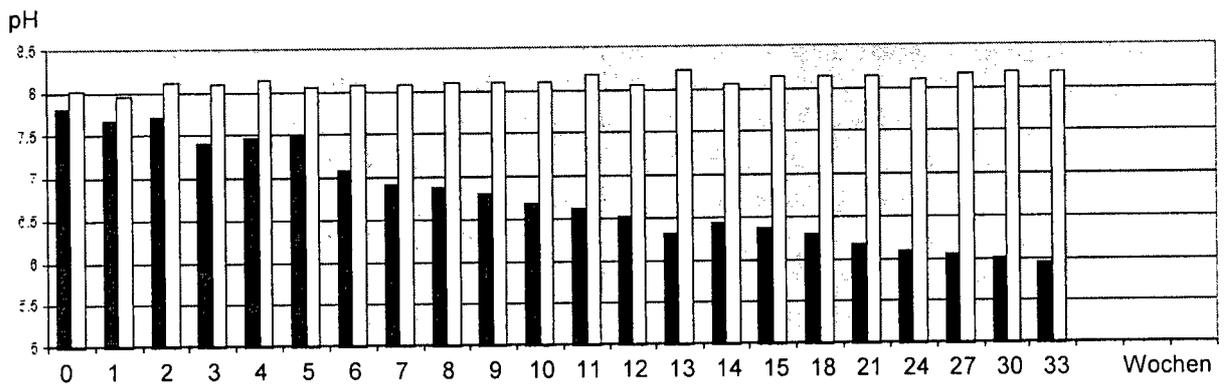


Fig. 2

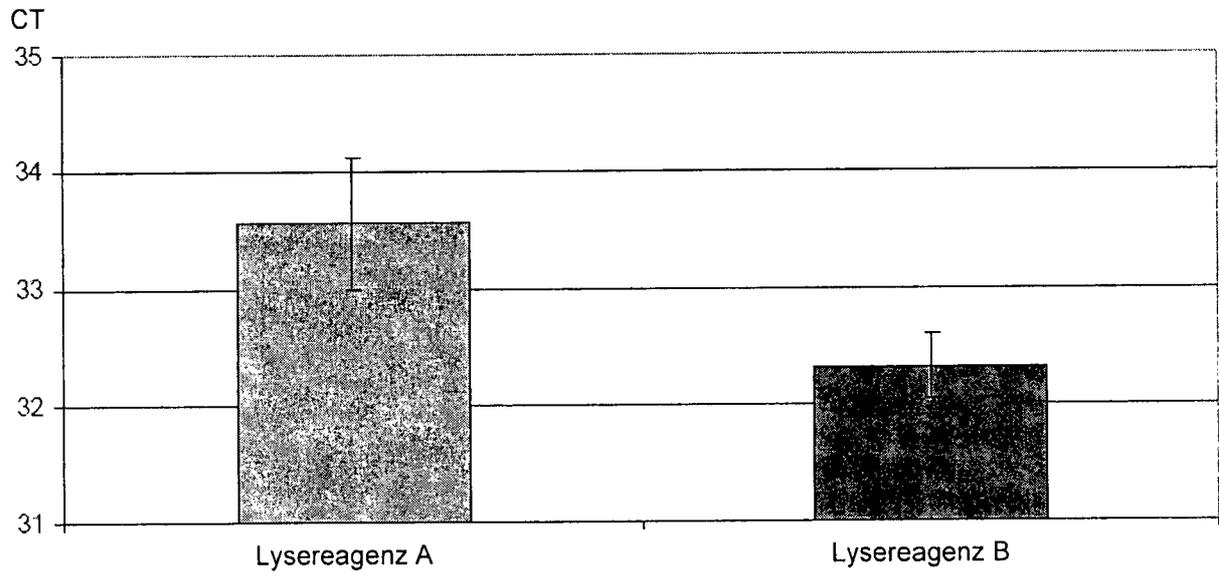


Fig. 3

